

· 中药工业 ·

蓝莓果实中花青素类成分的超声波提取工艺研究[△]杨莉¹, 李珂珂^{2*}, 李沙沙², 陈书笑¹, 陶丽², 弓晓杰^{2*}

(1. 大连大学 环境与化学工程学院, 辽宁 大连 116622; 2. 大连大学 医学院, 辽宁 大连 116622)

[摘要] 目的: 研究超声波提取法提取蓝莓中花青素类成分的工艺方法。方法: 采用正交试验, 选用 $L_9(3^4)$ 正交表考察超声波提取法提取时, 提取液的甲醇比例、提取液的盐酸含量、提取时间和料液比对蓝莓中花青素类成分提取率的影响。花青素的总含量用HPLC法测定。结果: 超声波提取法提取花青素类成分影响因素的大小顺序为盐酸含量>甲醇比例>提取时间>料液比, 最佳提取工艺条件为提取液80%甲醇-水溶液, 提取液含盐酸0.2%, 料液比1:25(g:mL), 提取时间50 min。结论: 采用优化的工艺条件稳定可行, 蓝莓中花青素类成分的含量为 $5.12 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

[关键词] 蓝莓; 花青素; 超声波提取; 正交试验

Study on Ultrasonic Extraction of Anthocyanins from Blueberry Fruit

YANG Li¹, LI Keke^{2*}, LI Shasha², CHEN Shuxiao¹, TAO Li², GONG Xiaojie^{2*}

(1. College of Environmental and Chemical Engineering, Dalian University, Dalian 116622, China;

2. College of Medical, Dalian University, Dalian 116622, China)

[Abstract] **Objective:** To study the method of extraction of anthocyanins from blueberry by ultrasonic extraction. **Methods:** Taking the ratio of methanol solvent, the ratio of added hydrochloric acid, the time of extraction and liquid to feed ratio as indexes, $L_9(3^4)$ orthogonal test was adopted to investigate the extraction of blueberry anthocyanins. The total content of anthocyanins was determined by HPLC. **Results:** The order of the influencing factors of ultrasonic extraction of anthocyanins from high to low was as follows: the content of hydrochloric acid, the ratio of methanol and the extraction time and liquid to feed ratio. Optimal ultrasonic extraction conditions were as follow: 80% methanol-water as solvent which contained 0.2% hydrochloric acid, liquid to feed ratio was 25:1 (mL:g), 50 min per time. **Conclusion:** The developed extraction process was stable and feasible, the content of anthocyanins in blueberry fruit was $5.12 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$.

[Keywords] Blueberry; anthocyanin; ultrasonic extraction; orthogonal test

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.2017.7.022

蓝莓, 又名蓝浆果、越橘, 为杜鹃花科(Ericaceae)越橘属 *Vaccinium* 多年生灌木果树。蓝莓果实风味独特, 除富含维生素、蛋白质和矿物质等常规营养成分以外, 还富含花青素, 并且种类丰富。花青素又称花色素, 是一类水溶性黄酮类化合物, 广泛存在于被子植物中^[1-2]。花青素作为一种天然食用色素, 具有较好的营养及药理作用。目前研究表明, 蓝莓中花青素类成分具有抗糖尿病作用^[3-4]、抗肿瘤作用^[5-6]及保护心血管作用^[7]等, 因此未来

在医药应用方面, 蓝莓花青素将具有很大的发展前景。

花青素类成分常见的提取方法有溶剂浸提法、微波辅助提取法、超声波辅助提取法等, 超声波法作为一种简便快捷的提取方法, 已广泛应用于提取实验^[8-9]。本文采用超声波提取法, 通过正交试验优化蓝莓中花青素的提取工艺, 预期为从蓝莓果实中获得较高含量的花青素类成分提供方法参考。

[△] [基金项目] 辽宁省科技厅科学技术计划项目(2014204007); 辽宁省优秀人才支持计划(LR2013058); 辽宁省自然科学基金(2015020657); 国家自然科学基金(81603272)

* [通信作者] 弓晓杰, 教授, 研究方向: 中药新药开发, E-mail: gxjclr@163.com; 李珂珂, 博士, 研究方向: 活性天然产物分离与活性筛选, E-mail: like905219@163.com

1 仪器与试剂

1.1 仪器

高效液相色谱仪 [Agilent 1260, Agilent Zorbax Eclipse XDB C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 美国安捷伦科技公司]; 超声波清洗机 (SB-5200DTD, 宁波新芝生物科技股份有限公司); 旋转蒸发仪 (EYELA N-1100, 上海爱朗仪器有限公司); 低温冷却液循环泵 (DLSB-5/20, 郑州长城科工贸有限公司); 电子天平 [ME204/02, 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]。

1.2 试剂

矢车菊素-3-*O*-葡萄糖苷 (Cy-glc) (北京恒元启天化工技术研究院); 甲醇 (色谱纯, 美国 TEDIA 公司); 纯净水 (杭州娃哈哈集团有限公司); 甲醇、丙酮、甲酸、盐酸 (分析纯, 天津科密欧化学试剂有限公司); 无水乙醇 (分析纯, 天津市大茂化学试剂厂); 蒸馏水为双蒸水。

蓝莓果实 (北陆) 采自辽宁省大连市亮甲店镇蓝莓种植基地, 4 °C 保存。

2 方法和结果

2.1 总花青素含量的测定

总花青素含量的测定采用高效液相色谱法 (HPLC)。色谱条件为流速: 0.8 mL · min⁻¹; 柱温: 35 °C; 检测波长: 520 nm; 进样量: 10 μL; 流动相: A 相为 6% 甲酸-水, B 相为甲醇。洗脱条件: 0 min: 10% B; 30 min: 25% B; 40 min: 45% B。

以矢车菊素-3-*O*-葡萄糖苷 (见图 1 中色谱峰 1) 为对照品, 花青素总量以矢车菊素-3-*O*-葡萄糖苷的含量表示。按标准曲线计算总花青素浓度^[10]。花青素总量计算式:

$$Z_{\text{总}} = C_{\text{总}} \times d/W \quad (1)$$

式中: Z 为花青素总含量 (mg · g⁻¹); C 为花青素总浓度 (mg · mL⁻¹); d 为花青素提取液总体积 (mL); W 为蓝莓样品质量 (g)。

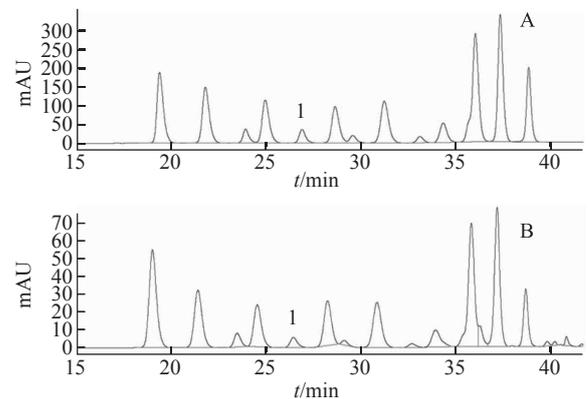
2.2 提取方法的确定

本实验首先选用超声法及回流法两种提取方法, 通过对比提取物在 HPLC 中的图谱特征, 比较两种提取方法的优劣。

超声提取法的提取条件: 准确称取 2 g 干燥至恒重的蓝莓果于 250 mL 锥形瓶中, 按照料液比 1:10

加入 20 mL 含 0.2% 盐酸的甲醇, 40 °C、300 W 下超声提取 30 min, 抽滤, 滤渣以上述操作重复提取一次, 合并两次滤液。将上述滤液在 40 °C 下于旋转蒸发仪真空浓缩, 用甲醇定容至 10 mL 容量瓶中, 得样品溶液, 经 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 进样 10 μL 进行 HPLC 分析。色谱图见图 1A。

回流法的提取条件: 准确称取 2 g 干燥至恒重的蓝莓果于 250 mL 圆底烧瓶中, 加入 20 mL 含 0.2% 盐酸的甲醇, 70 °C 下回流提取 30 min, 抽滤, 滤渣以上述操作重复提取一次, 合并两次滤液, 冷却至室温。将上述滤液在 40 °C 于旋转蒸发仪真空浓缩, 用甲醇定容至 10 mL 容量瓶中, 得样品溶液, 经 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 进样 10 μL 进行 HPLC 分析。色谱图见图 1B。



注: A. 超声法; B. 回流法; 峰 1 为矢车菊素-3-*O*-葡萄糖苷。

图 1 超声法和回流法得到蓝莓提取物的色谱图

对比图 1A 和图 1B 可知, 尽管两者提取出的花青素种类差别不大, 但超声法提取时, 得到的花青素类化合物的峰面积要明显大于回流法, 进一步计算其含量, 超声法提取时得到的总花青素含量为 4.26 mg · g⁻¹, 回流法提取时得到的总花青素含量为 1.58 mg · g⁻¹, 因此超声法比较适合提取蓝莓花青素类化合物。

2.3 提取溶剂的选择

准确称取 2 g 干燥至恒重的蓝莓果于 250 mL 锥形瓶中, 分别按照料液比 1:10 加入 20 mL 含 0.2% 盐酸的甲醇、无水乙醇、蒸馏水、丙酮, 40 °C、300 W 下超声提取 30 min, 抽滤, 滤渣以上述操作重复提取一次, 合并两次滤液。将上述滤液在 40 °C 于旋转蒸发仪真空浓缩, 用甲醇定容至 10 mL 容量瓶中, 得样品溶液, 经 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 进样 10 μL 进行 HPLC 分析。结果见图 2。

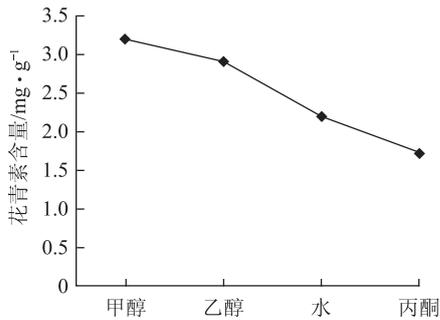


图2 不同提取溶剂对蓝莓花青素提取含量的影响

2.4 提取次数的选择

准确称取2 g干燥至恒重的蓝莓果于250 mL锥形瓶中,按照料液比1:10加入20 mL含0.2%盐酸的甲醇,40℃、300 W下超声提取30 min,抽滤,得滤液。分别以上述操作提取1次、2次及3次,合并滤液。将上述滤液在40℃于旋转蒸发器真空浓缩,用甲醇定容至10 mL容量瓶中,所得溶液经0.45 μm微孔滤膜过滤,进样10 μL进行HPLC分析。

根据测定的结果,提取1次即可提取出绝大部分花青素(4.86 mg · g⁻¹),提取2次基本提取完全(5.06 mg · g⁻¹),提取3次,花青素总量与2次时基本相同,因此,综合考量时间、成本、效果等多方面因素,本实验选择超声波提取次数为2次。

2.5 单因素试验

本实验分别考察了提取液浓度、提取液酸度、提取时间、料液比这4种因素在超声波提取时对花青素提取量的影响。

2.5.1 提取液浓度的影响 选甲醇为提取溶剂,甲醇浓度依次为100%、95%、90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%。结果见图3。

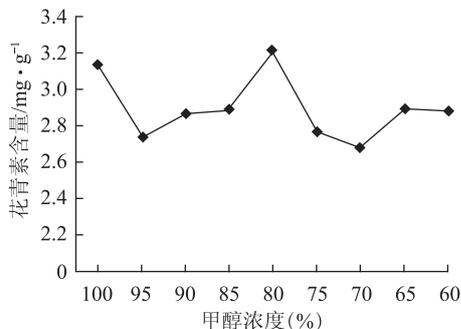


图3 提取液中甲醇浓度对蓝莓花青素提取含量的影响

由图3可知,花青素总提取含量随着甲醇浓度的减小先减小后增大再减小,当甲醇浓度为80%时

达到最大值,最终选择甲醇浓度是80%作为最佳条件。

2.5.2 提取液盐酸含量的影响 提取液中盐酸的含量依次为0、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%。结果见图4。

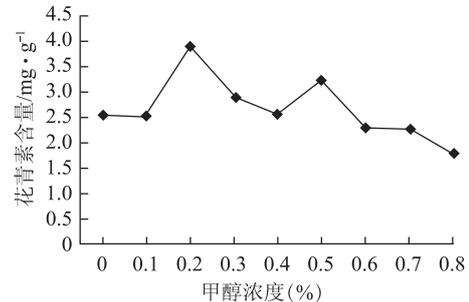


图4 提取液中盐酸含量对蓝莓花青素提取含量的影响

由图4可知,随着盐酸浓度的增大,花青素的提取率基本呈现先增大后减小的趋势,在盐酸含量为0.2%时总含量达到最大值,随后花青素提取率开始下降,分析原因可能是酸度过大,破坏花青素自身结构导致,因此选择提取液中盐酸的最佳浓度为0.2%。

2.5.3 提取时间的影响 提取时间分别选择20、25、30、35、40、45、50、55、60 min。结果见图5。

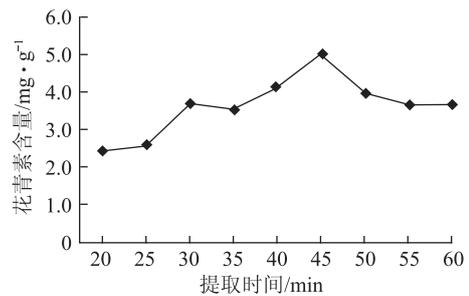


图5 不同提取时间对蓝莓花青素提取含量的影响

由图5可知,随着超声时间的延长,花青素总量呈现先增大后减小的趋势,在45 min时为最大得率,随后开始下降。原因可能为超声时间过长,超声波的剪切作用导致花青素结构遭到破坏^[11]。因此,超声波条件下提取的最佳时间为45 min。

2.5.4 料液比的影响 本实验所考察的料液比分别为1:5、1:10、1:15、1:20、1:25、1:30、1:35及1:45。结果见图6。

由图6可知,当料液比为较小值1:5时,花青素提取率较低,当料液比增大到1:20时,提取率达到最高,之后随着料液比继续增加,提取率有所降低。这可能是由于液料比越大,植物细胞内外的浓

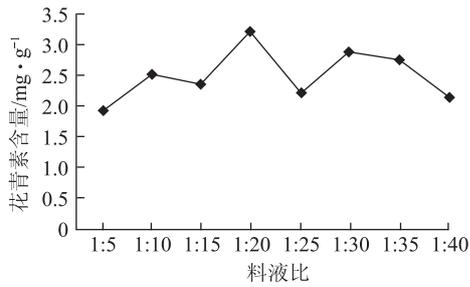


图6 料液比对花青素提取含量的影响

度差越大,传质推动力也就越大,有效成分扩散到细胞外的速度越大,越有利于花青素的析出,所以随着料液比的增大,提取率开始是增大的。而当溶剂太多时,辐射出的超声波被溶剂大量吸收,不能被蓝莓完全吸收,蓝莓的提取效果越来越差。

2.6 正交试验

根据单因素试验的考察结果,对提取液甲醇浓度(%)、盐酸含量(%)、超声时间(min)、料液比(g·mL)进行4个因素3个水平的正交试验设计,因素水平设计见表1,正交试验结果见表2。

由表2可知,蓝莓超声提取最佳工艺组合为A₂B₂C₃D₃,即甲醇浓度为80%,盐酸含量为0.2%,时间为50 min,料液比1:25。结果与单因素试验有所偏差,这是由于各因素之间有交互作用引起的。由极差分析可知,超声提取时影响花青素含量因素的主次顺序为B>A>C>D,即盐酸含量的影响最大,其余依次为甲醇浓度、时间,料液比的影响最小。

2.7 验证试验

按最佳组合做平行实验,3次测量所测得蓝莓中花青素含量为5.12 mg·g⁻¹,高于正交试验中的最高组合第5号实验结果5.06 mg·g⁻¹,这说明实验所确定的最佳提取工艺条件是可靠的。

2.8 总花青素含量测定的方法学考察

2.8.1 标准曲线的制作

将花青素对照品矢车菊素-3-O-葡萄糖苷配制成不同浓度的标准溶液,按照2.1的色谱条件,测定各浓度标准溶液的峰面积,以浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。得到矢车菊素-3-O-葡萄糖苷的线性关系方程: $Y = 19\ 845X - 103.66$,相关系数 r 为0.999 5,线性范围为0.007 5 ~0.21 mg·mL⁻¹。

表1 蓝莓花青素提取的正交试验因素水平表

水平	因素			
	甲醇浓度(%)	盐酸浓度(%)	时间/min	料液比/g·mL ⁻¹
	A	B	C	D
1	85	0.1	40	1:15
2	80	0.2	45	1:20
3	75	0.3	50	1:25

表2 蓝莓花青素提取的正交试验结果

实验号	因素				实验方案	实验结果
	A	B	C	D		
1	1	1	1	1	A ₁ B ₁ C ₁ D ₁	3.70
2	1	2	2	2	A ₁ B ₂ C ₂ D ₂	4.38
3	1	3	3	3	A ₁ B ₃ C ₃ D ₃	4.18
4	2	1	2	3	A ₂ B ₁ C ₂ D ₃	4.40
5	2	2	3	1	A ₂ B ₂ C ₃ D ₁	5.06
6	2	3	1	2	A ₂ B ₃ C ₁ D ₂	4.44
7	3	1	3	2	A ₃ B ₁ C ₃ D ₂	3.98
8	3	2	1	3	A ₃ B ₂ C ₁ D ₃	4.38
9	3	3	2	1	A ₃ B ₃ C ₂ D ₁	3.82
K1	12.26	12.07	12.52	12.58		
K2	13.90	13.82	12.61	12.81		
K3	12.19	12.45	13.21	12.96		
k1	4.09	4.02	4.17	4.19		
k2	4.63	4.61	4.20	4.27		
k3	4.06	4.15	4.40	4.32		
R	0.57	0.58	0.23	0.13		
主次顺序		B>A>C>D				
优水平	A ₂	B ₂	C ₃	D ₃		
优组合		A ₂ B ₂ C ₃ D ₃				

2.8.2 检出限和定量限

将所配制的标准溶液按照2.1中的色谱条件进样10 μL,调整进样浓度至信噪比分别为3和10,其相应浓度即为所求,最终测得检出限为0.30 μg·mL⁻¹,定量限为0.75 μg·mL⁻¹。

2.8.3 精密度

精确移取花青素对照品溶液,按照2.1中的色谱条件重复进样5次,计算峰面积值的相对标准偏差。结果其RSD值为0.91%,表明该方法精密度较高。

2.8.4 稳定性

取同一个蓝莓样品溶液,按照2.1中的色谱条件每隔2 h进样一次,同一天内共进样5次,计算日内精密度;每天进样一次,连续进样5 h,计算日间精密度。结果表明,日内精密度的RSD值为0.85%,日间精密度的RSD值为

1.02%，表明所测样品溶液的稳定性良好。

2.8.5 准确度 分别取1 mL已知浓度的蓝莓样品溶液3份，分别加入1 mL不同浓度的矢车菊素-3-O-葡萄糖苷对照品溶液，混合后按照2.1中的色谱条件进样3次，计算加样回收率，结果表明，平均回收率为99.97%，RSD值为1.81%，说明该方法准确度较高。

3 结论

本实验选用4种溶剂对蓝莓果实总花青素进行提取，筛选出最佳提取剂为甲醇，并通过单因素和正交试验研究了甲醇提取液浓度、盐酸含量、提取时间、料液比这4个因素对蓝莓花青素提取含量的影响。在实验考察的4种因素中，影响主次顺序为：盐酸含量 > 甲醇提取液浓度 > 时间 > 料液比，得到的最佳提取工艺条件为：甲醇浓度80%、盐酸含量0.2%、提取时间50 min、料液比1:25。此工艺方法简单、成本较低、可操作性强，可以应用于蓝莓花青素的工业提取，具有一定的开发和应用前景。

参考文献

- [1] 朱晓双,刘春燕,杨振.花青素合成关键酶基因的定位及结构分析[J].大豆科学,2011,30(1):24-28,32.
- [2] 肖丽霞,汪芬,张超,等.提取剂对紫玉米花青素提取量的影响[J].农产品加工,2009,8(6):38-40.
- [3] Liu J,Gao F Y, Ji B P, et al. Anthocyanins-rich extract of wild Chinese blueberry protects glucolipotoxicity-induced INS832/13 β -cell against dysfunction and death[J]. J Food Sci Technol, 2015, 52(5):3022-3029.
- [4] Martineau L C, Couture A, Spoor D, et al. Anti-diabetic properties of the Canadian lowbush blueberry *Vaccinium angustifolium* Ait[J]. Phytomedicine, 2006, 13(9/10):612-623.
- [5] Sun J, Chu Y F, Wu X, et al. Antioxidant and antiproliferative activities of common vegetables [J]. J Agric Food Chem, 2002, 50(25):7449-7454.
- [6] Duthie S J. Berry phytochemicals, genomic stability and cancer: evidence for chemoprotection at several stages in the carcinogenic process [J]. Mol Nutr Food Res, 2007, 51(6):665-674.
- [7] Vendrame S, Daugherty A, Kristo A S, et al. Wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) consumption improves inflammatory status in the obese Zucker rat model of the metabolic syndrome[J]. J Nutr Biochem, 2013, 24(8):1508-1512.
- [8] 李婷,侯晓东,陈文学,等.超声波萃取技术的研究现状及展望[J].安徽农业科学,2006,34(13):3188-3190.
- [9] 赵旭博,董文宾,于琴,等.超声波技术在食品工业应用新进展[J].食品研究与开发,2005,26(1):3-7.
- [10] 周方,赵宏飞,杨洋,等.高丛蓝莓品种花青素含量与抗氧化能力比较[J].西南林业大学学报,2011,31(5):53-57.
- [11] Yao G L, Ma X H, Cao X Y, et al. Effects of power ultrasound on stability of cyanidin-3-glucoside obtained from blueberry[J]. Molecules, 2016, 21(11):1564.

(收稿日期 2017-03-13)